

Új terápiás lehetőségek vizsgálata gyermekkori lágyszöveti tumorokban

Doktori tézisek

Dr. Felkai Luca

Semmelweis Egyetem
Klinikai orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Csóka Monika, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Sebestyén Anna, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Vízkeleti Júlia Ph.D., részlegvezető főorvos
Dr. Szász Attila Marcell Ph.D., egyetemi oktató

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Vásárhelyi Barna, DSc., egyetemi tanár
Tagok: Dr. Tímár Botond, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Kriván Gergely, Ph.D., egyetemi oktató

Budapest
2020

1. Bevezetés

Az onkológiai kutatások középpontjában jelenleg a személyre szabott terápiák fejlesztése áll. Kutatásunkban lágyrész szarkómás betegek számára kerestünk új terápiás lehetőségeket. Választásunk azért erre a betegcsoportra esett, mert ezen malignitások kezelésében az elmúlt évtizedekben jelentős előrelépések nem történtek, így a túlélési eredményeik sem javultak lényegesen. Disszertáciomban az anaplasztikus limfóma kináz (ALK), mammalian target of rapamycin (mTOR) és a metabolikus útvonalak jellemzését mutatom be gyermekkori lágyrésszarkómás betegek mintáin.

2. Célkitűzések

A kutatás során célom volt:

1. A gyermekkori lágyrész szarkómák ALK státuszának vizsgálata.
 - Immunhisztokémiai vizsgálatokkal az ALK fehérje expresszióját, illetve
 - Fluoreszcens in situ hibridizációs (FISH) vizsgálattal az ALK gén lehetséges transzlokációs, amplifikációs eltéréseit jellemezni,
 - majd összevetni a két vizsgálati módszer eredményeit.
2. Új terápiás célpontokat keresni a gyermekkori rhabdomyosarkómák (RMS-k) kezeléséhez.
 - Az mTOR jelátviteli útvonal aktivitásának az mTOR komplex 1 (mTORC1) és mTOR komplex 2 (mTORC2) fehérjeinek mennyiségi vizsgálata a kemoterápia megkezdése előtt és a neoadjuváns kemoterápia után, valamint recidíva során vett szövetmintákban.
 - A rhabdomyosarkóma sejtek anyagcsere útvonalainak jellemzése a glikolízissel összefüggésben a foszfofruktokináz (PFK) és laktát-dehidrogenáz A (LDHA), az oxidatív foszforilációval a β -F1-ATPáz (ATPB), a pentóz-foszfát útvonallal a glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz (G6PDH), míg a glutamin hasznosítással kapcsolatban pedig a glutamináz (GLS) enzimek mennyiségének vizsgálatával.
3. Azokban az esetekben, ahol a terápiás célpont azonosítását és igazolását követően a kezelésben ALK inhibitor vagy az mTOR gátló szerek alkalmazására nyílt

lehetőség (ALK inhibitor crizotinib, alectinib vagy mTOR gátló temsirolimus), regisztráltuk és elemeztük a kezelés hatékonyságát és mellékhatásait.

3. Módszerek

3.1. Betegek

Vizsgálataink első szakaszában a 2010. és 2014. között a Semmelweis Egyetem II. számú Gyermekgyógyászati Klinikáján lágyrészsarkóma diagnózissal kezelt betegek közül választottuk ki a magas kockázatú és recidiváló eseteket, akiknél az ALK inhibitor kezelésnek jelentősége lehet. A 18 vizsgált eset között 2 alveoláris lágyrészsarcomás, 2 alveoláris, valamint 11 embrionális rhabdomyosarcomás és 3 inflammatorikus myofibroblastos tumoros (IMT-os) gyermek volt.

Kutatásunk második szakaszában pedig a 2007. és 2017. között a magyarországi gyermekonkológiai központokban RMS miatt kezelt beteganyagon végeztük el vizsgálatainkat. 48 beteg 65 szövettani mintáját tudtuk összegyűjteni. A rbdomyosarkómával diagnosztizált gyermekek mintái között 53 embrionális, 7 alveoláris és 5 olyan minta volt, ami vagy a botrioid, vagy az orsósejtes altípusba tartozott. Mivel célkitűzéseink között szerepelt a kezelést követő és recidíva során bekövetkező mTOR és metabolikus változások jellemzése, ezért amennyiben lehetséges volt a kezelés megkezdése előtt, a diagnózis felállításakor vett minták mellett olyan mintákat is feldolgoztunk, amelyeket a kemoterápiás kezelés utáni tumoreltávolító műtét során, illetve a recidíva igazolásakor vettek.

3.2. Az ALK vizsgálata

3.2.1. Az ALK immunhisztokémiai vizsgálata

Az immunhisztokémiai vizsgálatok formalin fixált, paraffinba ágyazott biopsziás minták, 3 µm vastagságú szövettani metszetein végeztük el. A monoklonális 5A4 ALK antitestet (Novocastra, Leica) 1:10 hígításban alkalmaztuk. Pozitív kontrollként egy ALK pozitív IMT mintát alkalmaztunk. Az esetet akkor tekintettük ALK pozitívnak, ha 10 látótér vizsgálata esetében a tumorsejtek több mint 10 %-a mutatott pozitív reakciót. A festődés intenzitása szerint negatív, egy, kettő és három kereszt erősségű csoportokba soroltuk az

eseteket. 10 és 50 % között egy kereszt (+), 50 és 80 % között két kereszt (++) még 80 % felett három kereszt (+++) erősségűnek minősítettük a festődést.

3.2.2. ALK fluoreszcens *in situ* hibridizáció

A FISH vizsgálatok is formalinban fixált, paraffinba ágyazott 3 µm vastagságú szövettani metszeteken történtek. ALK Dual Color Break Apart (Vysis, Abbott Molecular Inc.) FISH próbát alkalmaztuk. Az értékelés során, fluoreszcens mikroszkópban 8-10 látótérben számoltunk le legalább 100 sejtmagot. Amennyiben a vizsgált sejtek legalább 15 %-ában detektáltunk ALK amplifikációt vagy transzlokációt, akkor a mintát pozitívnak tekintettük. A transzlokáció igazolásához szükséges kritérium a zöld és piros szignálok közötti legalább két jelátmérőnyi szétválás volt. Amplifikáció esetén a detektált jeltöbbletnek legalább négyszeresnek kellett lennie, hogy a pozitivitást kimondhassuk.

3.3. Az mTOR és anyagcsere útvonalak immunhisztokémiai vizsgálata

Kutatásunk második szakaszában az összegyűjtött szövettani mintákból tissue microarray (TMA) blokkokat készítettünk (3DHistech TMA Master, Hungary). Összesen két TMA blokk készült, melyek egyenként 6-szor 8 darab 2 mm átmérőjű szövethengert tartalmaznak. Egy eredeti szövettani blokkból 2, esetenként 3, reprezentatív területen található szövethenger is kiválasztásra, eltávolításra került. A reprezentatív területek kijelölését hematoxin-eozin (HE), desmin és Myf4 festéseket követően patológus segítségével végeztük. Kontrollként máj, garatmandula és here szöveteket alkalmaztunk. Célunk a TMA blokkok elkészítésével az erőforrásaink és a minták gazdaságosabb felhasználása, és az összehasonlító elemzések során a festések standardizáltabb kivitelezése volt. Azon betegek szövettani mintáit használtuk fel, akiknek a kezelése befejeződött, illetve a minta nagysága lehetővé tette, hogy a szövettani hengerek eltávolítását követően is elégséges mennyiségű tumor szövet maradjon, a betegek számára esetleg szükséges, későbbi diagnosztikai vizsgálatokhoz. Amely esetekben ezek a kritériumok nem teljesültek, ott külön teljes szövettani metszeteken végeztük el a vizsgálatokat. Az immunhisztokémiai festések esetében 4 µm vastagságú szövettani metszetekkel dolgoztunk.

Az mTOR útvonal *in situ* vizsgálatához anti-pmTOR (Cell Signaling, #2976), anti-pS6 (Cell Signaling, #2211) és anti-Rictor (Bethyl, A500-002A) antitesteket használtunk. Az

anti-pmTOR antitest az mTOR kináz aktív formáját ismeri fel, így általánosan markere az mTOR aktivitásának. Annak érdekében, hogy a C1 és C2 aktivitást megfelelően el tudjuk különíteni, további immunfestéseket alkalmaztunk. Az mTORC1 aktivitást az anti-pS6 antitest alkalmazásával vizsgáltuk. Ezen foszfoprotein az mTORC1 aktivitásával áll összefüggésben. Vizsgálatunk során a Rictort alkalmaztuk mTORC2 markernek, mely protein az mTORC2 egyik alkotó eleme. A Rictor expresszió az mTORC2 mennyiségével mutat korrelációt, így az mTORC2 aktivitást a Rictor, pmTOR és pS6 koexpresszióval jellemeztük. Az anyagcsere útvonalak karakterizálásához anti-PFK (Cell Signaling, #8164), anti-ATPB (Abcam, ab14730), anti-G6PDH (Abcam, ab133525), anti-LDHA (Cell Signaling, #3582), anti-GLS (Abcam, ab156876) antitesteket alkalmaztunk.

Az immunhisztokémiai vizsgálatok kiértékelése ebben a munkafolyamatban a „histo-score”, azaz H-score alkalmazásával történt. A H-score megállapítása úgy történik, hogy a festődő sejtek mennyiségét, százalékban kifejezve, össze kell szorozni a festődés kereszt erősségben kifejezett értékével, majd a kapott értékeket össze kell adni. A 100-as H-score értéket el nem ért metszeteket értékeltük negatívnak.

3.4. Statisztikai adatanalízis

Az exploratív vizsgálat statisztikai adatanalízise az IBM SPSS Statistics 21 program segítségével készült. Az eredményeinket szövettani altípus, rizikó besorolás, túlélés és mintavételi időpont (primer, kezelést követően eltávolított vagy recidív minta) szerint elemeztük. Normál eloszlású mintáinknál (primer minták Rictor, ATPB, G6PDH eredményei) H-score értékek (skála változó) szerint a statisztikai analízist T-próbát és egy szempontos ANOVA-tesztet alkalmazva elemeztük. Nem normál eloszlású mintáink esetében Mann-Whiney U tesztet alkalmaztunk. A mintákat pozitivitas (binomiális változó) alapján is összehasonlítottuk Fisher-egzakt tesztet használva. A változóink közötti korrelációs összefüggéseket Spearman korreláció segítségével vizsgáltuk. Szignifikánsnak azokat az összefüggéseket értékeltük, amelyek p értéke kisebb volt, mint 0,05.

4. Eredmények

4.1. Az ALK státusz vizsgálata

A lágyszarkómás betegek ALK státuszának meghatározását kétféle módszer segítségével végeztük el, hogy lehetőségünk legyen az immunhisztokémiai festés és a FISH technika eredményeinek összehasonlítására. Azokban az esetekben, ahol a betegek primer és recidív mintája is rendelkezésünkre állt, az ALK státusz változását is meg tudtuk vizsgálni.

18 beteg mintáját FISH-sel vizsgálva 1 esetben amplifikációt, míg 3 esetben transzlokációt igazoltunk. Immunhisztokémiai festéssel mindössze 3 esetben tudtuk az ALK fehérje expressziójának jelenlétét kimutatni. Az amplifikált esetben nem jelent meg az ALK fehérje expressziója, így ezen detektált genetikai eltérés szerepe kérdéses.

A vizsgált esetek között 6 beteg esetében a recidív mintákban is el tudtuk végezni a festéseket. Egy esetben változott a recidív daganat ALK státusza a primer daganathoz képest, ebben az esetben a recidív tumor a primerrel ellentétben már ALK pozitívnek bizonyult. Ez a beteg később ALK inhibitor kezelésben részesült.

4.2. Az mTOR aktivitás vizsgálata

4.2.1. Primer minták vizsgálata

Az mTOR kináz aktivitásának vizsgálatára használt pmTOR antitest a minták 56 %-ában (25/45 minta) mutatott fokozott immunpozitivitást. Az mTORC1 aktivitásának detektálására alkalmazott pS6 festés esetében a minták mindössze 18 %-ban (8/45 minta) figyeltünk meg pozitivitást. Az mTORC2 markereként alkalmazott Rictor immunfestés a minták 82 %-ában (37/45 minta) igazolt emelkedett Rictor expressziót. A munkacsoport korábbi munkáival összhangban, a pmTOR, pS6 és Rictor festődés többségében citoplazmatikus lokalizációt mutatott, azonban sok esetben magi pmTOR pozitivitást is megfigyeltünk. A pmTOR sejtmagi és citoplazmatikus expressziója egyaránt pozitívként értékelhető.

Összességében ezen eredményeink alapján a vizsgált 45 primer rhabdomyosarkómás minta 64 %-ában (29/45 minta) mutattunk ki pmTOR és/vagy pS6 immunpozitivitást, amely biztosan jelenlévő mTOR aktivitást igazolt. Az emelkedett Rictor és alacsony pS6

expresszió alapján mTORC2 dominancia figyelhető meg a primer rhabdomyosarkóma sejtekben.

A primer minták eredményeit összehasonlítottuk szövettani altípus, rizikó besorolás és túlélés szerint is. Szignifikáns eredményként emelnénk ki, hogy megfigyeléseink alapján a PAX-FOXO fúzió pozitív minták között szignifikánsan több esetet jellemzett emelkedett Rictor expresszió (T-próba, $t(43)=-2,41$, $p=0,020$), mint a fúzió negatívak között. A fúzió negatív esetek 80 %-ban (32/40 minta) míg a fúzió pozitív esetek 100 %-ában (5/5 minta) igazoltunk fokozott Rictor expressziót.

4.2.2. Kemoterápiát követően vett minták jellemzése, összehasonlító analízise

Összegyűjtöttük a kemoterápiás kezelés során (neoadjuváns kemoterápia után) eltávolított reziduális tumorból vett és rendelkezésre álló szövettani mintákat. Összesen 9 beteg mintáját volt lehetőségünk vizsgálni. A minták 33,3 %-a (3/9 minta) mutatott pmTOR immunpozitivitást, pS6 festéssel 66,7 %-ban (6/9 minta), Rictor festéssel 77,8 %-ban (7/9 minta) találtuk a mintákat pozitívnak.

A kemoterápiás kezelés közben eltávolított reziduális tumorból vett szövettani mintákat nem csak önálló csoportként, hanem az azonos betegek primer mintáival összehasonlítva is elemeztük. Összességében 8 primer-neoadjuváns tumor pár esetében tudtuk a fehérje expresszió változásokat értékelni. A pmTOR expresszió változatlan maradt (Mann-Whitney U teszt, $U=143,5$, $p=0,171$), a Rictor (T-próba, $t(52)=-2,12$, $p=0,019$) expresszió halványabbnak bizonyult, míg a pS6 H-score értékek az előbbiekkal ellentétben emelkedettnek találtuk (Mann-Whitney U teszt, $U=75$, $p=0,003$). Ennek hátterében azonban nem diffúzan erősebb pS6 festődést, hanem az egyedül álló, „3+” intenzitással festődő sejtek számának növekedését figyeltük meg. Ezen megfigyelést nem a fokozódó mTORC1 aktivitásnak, hanem a mitotikus orsó gátló szerek hatása alól felszabaduló sejtek osztódásnak tudjuk be.

4.2.3. Recidíva során vett minták jellemzése, összehasonlító analízise

Vizsgálatunkban célul tűztük ki a recidíva során létrejövő változások jellemzését is. Összesen 11 beteg recidív mintáját volt lehetőségünk vizsgálni. A pmTOR a minták 64 %-ában (7/11 minta), a pS6 9 %-ában (1/11 minta), míg a Rictor a minták 55 %-ában (6/11 minta) mutatott fokozott expressziót. A recidív mintákat összehasonlító elemzésnek

vetettük alá szövettani alcsoport, fúziós státusz, túlélés és rizikóbesorolás szerint. Vizsgálataink egy esetben igazoltak szignifikáns összefüggést. A pS6 expresszió a magas rizikójú csoportban szignifikánsan emelkedett volt a kezdetben nem magas rizikócsoportba eső betegekhez képest (Mann-Whitney U teszt, $U=0$, $p=0,014$). Bár ezen összefüggés szignifikáns, de a jelentősége mégis kérdéses, mivel mindkét csoportban kifejezetten alacsony pS6 expresszió volt megfigyelhető. Továbbá a kezelésre nem reagáló betegek esetében kifejezetten fokozott pmTOR expressziót észleltünk azon betegekhez képest, akik a recidív kezelés hatására ismételt remisszióba kerültek. Ezen eredményünket statisztikai szignifikanciával nem tudtuk alátámasztani, további vizsgálatot igényel nagyobb esetszámú tanulmányban.

A 11 recidív beteg mintáját 9 esetben volt lehetőségünk azonos betegtől vett primer mintapárjával összehasonlítani. Habár a mintapárok elemzésekor a pmTOR expresszió fokozódását figyeltük meg (Mann-Whitney U teszt, $U=216$, $p=0,516$) továbbra megtartott Rictor pozitivitás (T-próba, $t(53)=1,54$, $p=0,446$) és csökkent pS6 festődés (Mann-Whitney U teszt, $U=224,5$, $p=0,635$) mellett, ezen megfigyeléseink nem bizonyultak statisztikailag szignifikánsnak.

4.3. A metabolikus enzimek expressziójának vizsgálata

4.3.1. Primer minták jellemzése

A glükóz hasznosítás útvonalainak jellemzéséhez a PFK és LDHA (glikolízis markerek) és az ATPB (oxidatív foszforiláció markere) enzimek vizsgálatának eredményeiből következtettünk. A primer minták vizsgálata során a PFK 18 %-ban (8/45 minta), az LDHA 53 %-ban (24/45 minta), valamint az ATPB 36 %-ban (16/45 minta) mutatott fokozott expressziót. Az emelkedett LDHA, az alacsony PFK és ATPB expresszió összességében a RMS sejtekben a Warburg-effektus jelentőségére hívják fel a figyelmet a mitokondriális oxidatív foszforilációval szemben. Statisztikai adatanalízist végeztünk szövettani alcsoport, túlélés, valamint rizikóbesorolás szerint. Statisztikailag szignifikáns különbséget egy esetben detektálunk, a PAX-FOXO fúzió pozitív minták esetében szignifikánsabb több PFK immunpozitív esetet detektáltunk a fúzió negatív esetekkel összehasonlítva (Fisher-egzaktsági teszt, $p=0,033$).

A G6PDH festések mintázatának értékelésével a pentóz-foszfát út aktivitásának jellegzetességeit igyekeztünk megismerni. A primer szövettani mintákon végzett

vizsgálatok figyelemre méltó immunpozitivitást mutattak, a minták 82 %-ában (37/45 minta) volt látható erős enzim expresszió. Ezen eredményeink alapján feltételezhető a pentóz-foszfát útvonal aktivitásának jelentősége a primer tumorok esetében. Szignifikáns különbség nem igazolódott szövettani beosztás, túlélés és rizikó besorolás szerint.

A GLS (glutaminolízis markere) expresszió magas volt a primer esetek 69 %-ában (31/45 minta). Eredményeink alapján valószínűsíthető a rhabdomyosarkóma sejtek emelkedő glutamin hasznosítási igénye. Szignifikáns különbség nem igazolódott szövettani beosztás, túlélés és rizikó besorolás szerint.

4.3.2. Kemoterápiát követően vett minták metabolikus markereinek jellemzése

Kemoterápiát követő mintát 9 betegről tudtunk gyűjteni és 8 esetben tudtuk párba állítani primer mintával. Kemoterápia hatására létrejövő szignifikáns változást egy esetben sem tudtunk igazolni. A PFK 22 %-ban (2/9 minta), az LDHA 56 %-ban (5/9 minta), a ATPB 44 %-ban (4/9 minta), a G6PDH 67 %-ban (6/9 minta), valamint a a GLS 56 %-ban (5/9 minta) mutatott immunpozitivitást.

4.3.3. Recidív minták metabolikus markereinek jellemzése

11 a recidíva során vett mintát jellemeztünk, valamint 9 esetben tudtuk a primer- recidív párok enzimexpresszióját összehasonlítani. A PFK 27 %-ban (3/11 minta), az LDHA 82 %-ban (9/11 minta), ATPB 91 %-ban (10/11 minta), a G6PDH 27 %-ban (3/11 minta), valamint a GLS 46 %-ban (5/11 minta) mutatott immunpozitivitást. Szignifikáns különbséget a primer és recidív minták enzimexpressziója között mindössze a G6PDH esetében tudtunk igazolni. A recidív minták immunpozitivitása gyengébbnek mutatkozott (T-próba, $t(54)=4,06, p=0,004$). G6PDH expresszió alapján progresszió során már nem igazolható a pentóz-foszfát útvonal jelentős szerepe RMS sejtekben.

4.4. A vizsgált mTOR és metabolikus markerek közötti korreláció

A vizsgált immunhisztokémiai markerek közötti korrelációt Spearman korrelációs analízissel elemeztük. Összesen 28 korrelációt vizsgáltunk. Az elvégzett elemzések igazolták az mTOR aktivitás, az LDHA és a GLS expresszió között összefüggéseket a vizsgált esetekben. Pozitív összefüggéseket találtunk az pmTOR és az LDHA expresszió ($R = 0,403, p < 0,05$), valamint az pmTOR és a GLS expresszió között ($R = 0,302, p$

<0,05). A többi talált szignifikáns korreláció jelentősége kérdéses. (LDHA-PFK (R=-0,508, p <0,05), GLS- Rictor (R=-0,306, p <0,05), GLS-ATPB (R=0,306, p <0,05))

4.5. Esetbemutatók

Az általunk elvégzett vizsgálatok célja azon betegek azonosítása volt, akiknél relapszus vagy tumorprogresszió esetén előnyt jelenthet célzott terápiás kezelés alkalmazása. A vizsgált tumorok ALK, illetve mTOR pozitivitásának igazolásával lehetőség nyílik inhibitoraik alkalmazására. Az általunk vizsgált gyermekek közül ketten meg is kapták az célzott terápiás kezelést. A kezelés hatásait és mellékhatásait retrospektíven elemeztük és vetettük össze *in situ* vizsgálataink eredményeivel.

4.5.1. Alveoláris rhabdomyosarkóma esetbemutató

A 8 éves fiúgyermek láz és jobb alsó végtagi fájdalom miatt jelentkezett kivizsgálásra. MR vizsgálat igazolta a multiplex, oszteolitikus csontfolyamatot, mely érintette a gerincet, a medencét, illetve a térd régiójában valamennyi csontot. A biopsziás mintavétel csontra lokalizált alveoláris rhabdomyosarkómát igazolt. Kemoterápiás kezelése a CWS 2012 metasztatikus ágán megkezdődött, melyre jól reagált, a betegsége remisszióba került. A kezelés befejezését követően hét hónappal kontroll képalkotó MR vizsgálaton a jobb femur disztális és a jobb tibia proximális részében megjelenő aktivitásfokozódás vetette fel a recidíva lehetőségét, amelyet biopszia igazolt. Ezt követően kemoterápiás kezelése a CWS 2012 protokoll recidív ágán folytatódott. A gyermek súlyosan elesett állapotú volt. Fájdalma nehezen volt csillapítható, mozgásban súlyosan korlátozta a beteget. Az általános jóllétet felmérő Karnofsky-Lansky skálán 20 %-ot ért el.

A recidív mintában ALK pozitívítás igazolódott, mely eredmény alapján crizotinib terápia indult 2x280 mg/m² adag alkalmazásával (reggel 200 mg, este 400 mg dózisban). A kezelés hatására a követett elváltozások jelentősen regrediáltak. A betegnél súlyos mellékhatások nem jelentkeztek, mindössze enyhe fokú, átmeneti szikralátás és ízérzés zavar, valamint a gyógyszer szedésének kezdeténél hányinger, hányás. A gyermek általános állapota is jelentősen javult, fájdalmai megszűntek, aktivitásában alapbetegsége nem korlátozta, a jólléti skálán 100 %-os volt az aktivitása. A crizotinib kezelés harmadik hónapjában kiújuló jobb térdre lokalizálódó fájdalom miatt, MR vizsgálat történt, amely igazolta a tumoros folyamat progresszióját. Ezután egy ciklus kombinált topotecan,

karboplatin kezelésben részesült, mely mellett panaszai fokozódtak. Enyhe pmTOR és pS6 pozitivitás alapján tizenkét ciklus mTOR gátló temsirolimus kezelést kezdtünk, mely mellett folyamatos tumorprogresszió volt észlelhető, ezért kezelését leállítottuk. A megkezdett palliatív ellátás mellett a gyermeket három hónappal később veszítettük el. Jelen vizsgálatunk során ezen beteg mintái ismételt patológiai vizsgálatoknak vetettük alá, melyek a Rictor emelkedett expresszióját igazolták, alacsony pS6 immunpozitivitás mellett, ami a korábbi vizsgálatban még nem meghatározott emelkedett mTORC2 aktivitásra utal ebben az esetben. Ezen eredmények magyarázatul szolgálhatnak az mTORC1 inhibitor kezelésre elmaradó terápiás válasza.

4.5.2. Inflammatorikus miofibroblasztos tumor esetbemutató

A hatéves fiúgyermek panaszai bizonytalan jobb csípőtáji fájdalommal kezdődtek. Feltárással biopszia történt, a szövettan inflammatorikus miofibroblasztos tumort igazolt. A beteg gyógyulását eredményező, onkológiai radikalitású műtét a tumor infiltratív terjedése miatt nem volt kivitelezhető. Két hónap elteltével kifejezett progresszió és kismencedei propagáció mutatkozott. Kortikoszteroid kezeléssel kiegészített kemoterápiát kezdtünk a CWS 2009 protokoll magas kockázatú ágán. Kontroll MR felvételen az előzetes vizsgálatokhoz képest gyakorlatilag változatlan kép ábrázolódt. Szövettani vizsgálat során immunhisztokémiai módszerrel ALK pozitivitás igazolódt, melyet a FISH vizsgálat megerősített. Az elmaradt terápiás válasz miatt a kemoterápiás kezelését felfüggesztettük, majd crizotinib kezelés indult napi kétszer 250 mg dózisban (2x 280 mg/m²).

A crizotinib kezelés megkezdése előtt gyermek általános állapota rendkívül rossz volt, fájdalmai erősek voltak, nyugalomban is jelentkeztek. A Karnofsky-Lansky skálán az állapota 20-30 %-ot ért el. Otthonában folyamatos ellátásra és kábító fájdalomcsillapító adására szorult. Crizotinib kezelés hatására jelentős mértékben csökkent a tumor mérete. Korábbi panaszai gyorsan javultak, a kezelés megkezdése utáni első hónap végére a Lansky jólléti skálán elérte a 80 %-ot. A kezdeti mellékhatások szikralátás, ízérzés zavar, bradikardia, elektrolit eltérések voltak, de nem jelentkeztek olyan erősen, hogy a kezelést meg kellett volna szakítani.

A több, mint két évig tartó crizotinib kezelés mellett folyamatos regresszió volt látható a kontroll MR felvételeken. A gyermek, akit betegsége mozgáskorlátozottá, ágyhoz kötötté

tett iskolába járt, még a testnevelés órán is részt tudott venni. Ezen beteg számára a teljes gyógyulást a tumor sebészi eltávolítása jelentheti, de ez csak jelentős csomók mellett lett volna kivitelezhető, így a cél a betegség remisszióban tartása addig, míg a gyermek el nem éri azt a testméretet, feltehetőleg a kamaszkora végén, amikor a protézis beültetés lehetővé válik számára.

Mivel a tumor aktivitása az MR felvételeken teljesen megszűnt, huszonöt hónap után a crizotinib kezelést felfüggesztettük. A kezelés leállítását követő hetekben a gyermek fájdalma visszatért, az MR progressziót igazolt, így a crizotinib terápiát visszaállították. 2019. áprilisában végzett MR vizsgálat új elváltozás megjelenését igazolta a korábbi követett tumortömeg mellett. Júniusban történt biopsziás mintavétel igazolta a daganat megtartott ALK pozitivitását. Crizotinib rezisztencia miatt, egyedi engedélyezést követően, 2019. szeptemberében megkezdődött a fiú alectinib, egy második generációs ALK-inhibitor, kezelése napi egyszer 600 mg dózisban. A követett elváltozás már a kezelés első hónapjának végére 30 %-os regressziót mutatott, a gyermek továbbra is panaszmentes, mellékhatásokat nem tapasztalt.

5. Következtetések

Kutatásunk eredményeit összefoglalva:

1. A gyermekkori lágyszarkómákban
 - az ALK státusz immunhisztokémiai vizsgálata során igazoltuk az ALK gén eltéréseit és az újonnan megjelenő fehérje expresszióját: a vizsgált esetekben az alveoláris rhabdomyosarkómák 50 %-a, az inflammatorikus miofibroblasztos tumorok 67 %-a volt ALK pozitív, míg a vizsgált embrionális rhabdomyosarkómák és alveoláris lágyszarkómák negatívak voltak.
 - Az ALK immunpozitív esetekben a genetikai eltérést, transzlokációt is kimutattuk. Egy további esetben mutattunk ki amplifikációt ALK fehérje expresszió nélkül, így ennek az eltérésnek a klinikai jelentősége kérdéses.
 - Eredményeink alapján az ALK pozitívítás megítélésére célszerű a tumorigenezis során a sejtekben újonnan megjelenő ALK fehérje immunhisztokémiai kimutatását alkalmazni és ehhez kiegészítésként végezni FISH vizsgálatot.

2. A rhabdomyosarkóma szövettani minták mTOR jelátviteli útvonalhoz kapcsolt fehérjéinek és metabolikus enzimeinek *in situ* expresszió vizsgálatával a következőket állapítottuk meg:

- A kezelés előtti, primer szövettani minták daganatsejtjeiben fokozott mTOR aktivitást, a detektált fehérje expressziós mintázat alapján jellemzően mTORC2 aktivitást mutattunk ki, amellyel az mTORC2 jelátviteli útvonal fokozott aktivitását igazoltuk rhabdomyosarkómákban. Az mTORC2 aktivitás szignifikánsan nagyobb volt a PAX-FOXO fúzió pozitív esetekben a fúzió negatívakhoz képest. Kemoterápiát követően az mTOR aktivitás szöveti szinten nem változott, míg recidív szövetmintákban, elsősorban azokban a betegekben ahol a másodvonalbeli kezelés hatástalan volt, a primer mintákban tapasztaltakhoz képest fokozódott az mTOR aktivitás, megtartott mTORC2 dominancia mellett.
- A rhabdomyosarkóma sejtek metabolikus folyamatainak átrendeződését figyeltük meg:
 - A gyenge ATPB és erős LDHA immunpozitivitás a rhabdomyosarkóma sejtekben Warburg-effektus jelenlétére utal.
 - A G6PDH enzim fokozott expressziója alapján jelentős a pentóz-foszfát útvonal aktivitása is.
 - Az intenzív GLS immunpozitivitás a rhabdomyosarkóma sejtek fokozott glutaminhasználására hívja fel a figyelmet.
 - Az mTOR aktivitás szerepét támasztja alá a primer mintákban igazolt korreláció az mTOR aktivitás (p-mTOR expresszió) és az LDHA, illetve a GLS expresszió között.
 - A fenti anyagcsere útvonalak azonban kevésbé változtak a kemoterápiás kezelés hatására. A G6PDH szignifikáns csökkenést mutatott a recidív szövetmintákban.

3. Két esetben dokumentáltuk az alkalmazott célzott terápiás kezelések hatásait.

- az ALK inhibitor kezelés IMT esetben rendkívül hatékony lehet (IMT diagnózisú gyermek a több éve tartó folyamatos ALK inhibitor, crizotinib, majd alectinib kezelés mellett panaszmentes, remisszióban van és

jelentkező mellékhatások is csak enyhék voltak), míg más szarkómák esetében csak parciális válasz érhető el (alveoláris RMS miatt gondozott gyermek esetében a crizotinib kezeléssel mindössze parciális választ lehetett elérni)

- Egyes szarkómák kezelése során, terápia rezisztencia vagy relapszus esetében, felmerülhet az mTOR gátlók alkalmazása, de ezekben az esetekben a rapalógok hatástalanságának hátterében az mTORC2 komplex aktivitása fontos tényező lehet.

Az inflammatorikus miofibroblasztos tumorok esetében az ALK inhibitor kezelés hatékony lehet, jelenleg az ALK immunhisztokémiai vizsgálatok elvégzése a rutin diagnosztikával egy ütemben megtörténik. Egyedi off label engedéllyel szükség esetén valamennyi ALK pozitív IMT-ral diagnosztizált gyermek megkaphatja a szükséges ALK inhibitor kezelést. Az ALK inhibitor kezelés rhabdomioszarkóma esetében nem bizonyult hatásosnak. Feltehetőleg az ALK nem játszik fontos szerepet a tumorgenezisben akkor sem, ha expressziója, genetikai eltérése a daganatos szövetben igazolható. Továbbá az általunk kimutatott emelkedett mTORC2 aktivitás miatt a magas kockázatú esetekben érdemes az mTOR aktivitást pontosan jellemezni, hiszen ezen betegcsoport profitálhat az új mTOR inhibitor kezelésekből. A jövőben új terápiás célpontokként a megváltozott anyagcsere különböző útvonalai is szerepelhetnek.

6. Saját publikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó publikációk jegyzéke:

- **Felkai, Luca** ; Krencz, Ildikó ; Kiss, Dorottya Judit ; Nagy, Noémi ; Petővári, Gábor ; Dankó, Titanilla ; Micsik, Tamás ; Khor, András ; Tornóczky, Tamás ; Sági, Zoltán et al., Characterization of mTOR Activity and Metabolic Profile in Pediatric Rhabdomyosarcoma, **CANCERS** 12 Paper: 1947 (2020)
IF: 6.126 *
- **Felkai, L** ; Banusz, R ; Kovalszky, I ; Sapi, Z ; Garami, M ; Papp, G ; Karaszi, K ; Varga, E ; Csoka, M, The Presence of ALK Alterations and Clinical Relevance of Crizotinib Treatment in Pediatric Solid Tumors, **PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH** 25 : 1 pp. 217-224. , 8 p. (2019)
IF: 2.826 *

A disszertációtól független publikációk jegyzéke:

- Bots, Bianka ; Eipel, Olivér ; Terkovics, Lotte ; **Felkai, Luca** ; Csóka, Monika ,Lágyrészsarkómás gyermekek kezelési eredményei a Semmelweis Egyetem II. Sz. Gyermekgyógyászati Klinikáján, **MAGYAR ONKOLÓGIA** 62 : 4 pp. 222-229. , 8 p. (2018)
IF: -